

(54) PREPARATION OF UNIFORM HBsAg PARTICLES

- (11) Kokai No. 53-104724 (43) 9.12.1978 (19) JP
 (21) Appl. No. 52-18938 (22) 2.23.1977
 (71) MIDORI JUJI K.K. (72) HIROYUKI SHIRAISHI(2)
 (52) JPC: 30D1;30D3;113E6
 (51) Int. Cl². A61K39/12,G01N33/16

PURPOSE: To prepare HBsAg particles having high antigenicity, low side effects, and free from infectivity, useful as a raw material of serum-hepatitis vaccine, and standard antigen reagent, by heating HBsAg existing in human blood-plasma in the presence of a nonionic surface active agent and a protein-denaturing agent.

CONSTITUTION: Globular HBsAg particles having an isoelectric point of pH5.5–6.5, a molecular weight of 2–4 millions, specific gravity of 1.24–1.80, and diameter range of 180–200Å, are obtained by the heat treatment of a surface antigen of hepatitis virus B (HBsAg) in the presence of 0.1–2.0%W/V of a nonionic surface active agent, selected from polyoxyethylene (7–10) alkylphenol and polyoxyethylene (20) sorbitan monoalkylester, and a protein-denaturing agent such as urea (pref. 4–6M) or guanidine (pref. 2–4M), and if necessary, a reducing agent such as 2-mercaptoethanol, at 30–50°C, pref. 35–40°C, for 5–120 min., pref. 20–50 min.

(54) STAINPROOFING AGENTS IN WATER

- (11) Kokai No. 53-104729 (43) 9.12.1978 (19) JP
 (21) Appl. No. 52-18055 (22) 2.23.1977
 (71) SHOWA DENKO K.K. (72) TAKASHI MINOURA(2)
 (52) JPC: 30F371.11;30F91;30F93;13(9)B94
 (51) Int. Cl². A01N9/20,C09K3/00

PURPOSE: To prepare stainproofing agents in water, which prevent to adhere sea lifes to vessels, fishing nets, submarine construction, etc., without environmental pollution, from amino acids, amino acid esters, etc., as active constituents.

CONSTITUTION: Stainproofing agents are prepd. from amino acids (e.g., glycine), amino acid 1–5C alkylesters, or their salts (e.g. glycine ethylester sulfate), etc., as active constituents. They are applied by adding ≥ 0.05 ppm, pref. 0.05 ~ 10 ppm of them to sea directly, or 5 ~ 50 wt.% of them to compositions such as paints.

(54) CONTROL FOR WEEDS IN BEAN CULTURE

- (11) Kokai No. 53-104730 (43) 9.12.1978 (19) JP
 (21) Appl. No. 52-17445 (22) 2.18.1977
 (71) KUMIAI KAGAKU KOGYO K.K.
 (72) KAZUO NAOHARA(3)
 (52) JPC: 30F371.217.3;30F932
 (51) Int. Cl². A01N9/20

PURPOSE: To control weeds with no phytotoxicity by foliar treatment of beans at the growing period with specific urea type herbicides.

CONSTITUTION: Weeds in bean culture are controlled by foliar treatment with herbicides contg. N-(4-phenoxyphenyl)-N'-methylurea as an active constituent. The concn. for their application is 50–30,000 ppm, pref. 500–5000 ppm.

公開特許公報

昭53—104724

⑪Int. Cl.²
A 61 K 39/12
G 01 N 33/16

識別記号

⑫日本分類
30 D 1
30 D 3
113 E 6

庁内整理番号
7432—44
6667—44
6904—49

⑬公開 昭和53年(1978)9月12日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 6 頁)

⑭均一なHBsAg粒子の製造方法

⑮特 願 昭52—18938

⑯出 願 昭52(1977)2月23日

特許法第30条第1項適用 昭和51年10月28日
～30日第24回日本ウイルス学会総会において
発表

⑰発明者 白石広行
仙台市米ヶ袋2丁目2—5

⑱発明者 白地良一

名取市名取ガ丘2丁目12番10号

同 石田名香雄

仙台市角五郎一丁目5の40

⑲出 願 人 株式会社ミドリ十字

大阪市城東区中央1丁目1番47号

⑳代 理 人 弁理士 浅村皓 外3名

明 細 書

1. 発明の名称

均一なHBsAg粒子の製造方法

2. 特許請求の範囲

特 許 HBsAg を、オキシエチレンを分子中に平均 7
～10 モル含有するポリオキシエチレンアルキル
フェノール及びオキシエチレンを分子中に平均約
2.0 モル含むポリオキシエチレンモノアルキルエ
ステルから選ばれた非イオン界面活性剤と尿素、
グアニジンから選ばれたタンパク変性剤を存在さ
せ、更に還元剤を存在させあるいは存在させずに、
加熱処理し、均一な変性 HBsAg 粒子を分取するこ
とを特徴とする等電点 pH 5.5～6.5、分子量 2～
4 百万、比重 1.24～1.80、直径 180～200Å
の球形粒子の高い抗原性を保持する均一な変性
HBsAg 粒子の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明はヒトの血漿中の HBsAg (Hepatitis B
surface antigen) から非イオン界面活性剤、タ
ンパク変性剤の存在下で加熱処理することによつ

て高い抗原性を保持した、等電点 pH 5.5～6.5、
分子量 2～4 百万、比重 1.80～1.24、直径
180～220Å の球形粒子の均一な変性 HBsAg
粒子の製造方法に関する。

B 型肝炎ウイルス (HBV) はヒトの血清肝炎を
起すウイルスとして知られ、輸血を要する患者や
臨床検査、血漿製剤に従事する者にしばしば感染
し、誠にやつかいな問題を引き起す。今日 HBV
はコア抗原 (HBcAg) と表面抗原 (HBsAg) 及び
。抗原とから成り立ちコアの中に DNA ポリメ
ーゼを持つ直径約 40 nm の大型粒子であること
が知られており [WHO テクニカルリポート シー
ーズナンバー 570、バイラルヘパティティス
(WHO technical Report Series No. 570、
viral hepatitis) 1975]、又アンチ-HBs
(Anti-HBs) がこの HBV の感染を予防し得
ることも既に明らかにされている。

又は血漿画分を密度勾配超遠心分離法によつて、密
度 1.20～1.25 の分画を得る方法 [J.L. グリン、P.V. ホランド
及び R.H. パーセル (J.L. Gerin, P.V. Holland

and R.H. Purcell) : ジャーナル オブ バイロロジイ (Journal of Virology) 第7巻、第569-576ページ (1971年) 及び N. スケノ、R. シラチ、J. ヤマグチ及び N. イシダ (N. Sueno, R. Shirachi, J. Yamaguchi and N. Ishida) : 同誌、第9巻、第182-183ページ (1972年)] によつて比較的純粋に得られていた。

更に新しくはアフィニティ-クロマトグラフィー法が提案されている (白石広行、石田名香雄、助野典義 : 日本ウイルス学会抄録昭和48年11月4、5、6日発表、東京において)。この方法の概要は次の通りである。

精製 HBsAg を動物、例えば山羊に免疫して得た山羊抗 HBs 血清に HBsAg を含まないヒトの血清を加えて混在するヒト血清成分に対する抗体を吸収沈殿させ、上清を硫酸アンモニウム沈殿分画法によつて α -グロブリン抗 HBs (anti HBs) を得る。臭化シアンで活性化したセファロース-4B (Sepharose-4B) とこの anti HBs とをカップ

リングさせ、この生成物のカラムを準備する。

HBsAg を含むヒト血漿、又はこれから常法によつて分画された α -及び β -グロブリン画分を 0.01 M リン酸緩衝液に懸濁し、遠心分離し、得られる上清について上記のカラムを用いてクロマトグラフィーを行う。カラムに結合した HBsAg を 0.4 M -グリシン-HCl (pH 2.5) 緩衝液で溶出し、溶出液を 0.01 M リン酸緩衝液に対して透析し、HBsAg 溶液を得る。この溶液を、前記のカラムと同様に、但し、山羊抗 HBs 血清を用いる代りに、動物、例えば馬に免疫して得た抗馬ヒト血漿血清を用いる以外は同様に調製したカラムを用いてクロマトグラフィーにかけ、微量に混在する血漿成分をカラムにとどめ精製 HBsAg 溶液を通過部分として集める。

HBsAg を構成するサブユニットについては、HBsAg を切断することによつて見い出されるペプチドを検索し、サブユニットは種々の分子量のポリペプチドを含むことが多くの報告者によつて報告されている。なわち、ゲリン (前出) は HBsAg

は、分子量 26,000、32,000 及び 40,000 のポリペプチドからなることを報告している。その外、それが、25,000 及び 32,000 の分子量のポリペプチド [G.N. ビヤス、E.W. ウィリアムス、GGB クラウス及び H.E. ボンド (G.N. Vyas, E.W. Williams, GGB Klaus and H.E. Bond) : ザ ジャーナル オブ イムノロジイ (The Journal of Immunology) 第108巻、第1114-1118ページ (1972年)]、39,000、32,000、27,000 及び 22,000 のポリペプチド並びに微量の 16,000 及び 10,000 のもの [G.R. ドレスマン、F.B. ホリンガー、J.K. スリアノ、R.S. フジオカ、J.P. ブルンシュウツヒ及び J.L. メルニク (G.R. Dressmann, F.B. Hollinger, J.R. Suriano, R.S. Fujioka, J.P. Brunschwig and J.L. Melnik) : ジャーナル オブ バイロロジイ、第10巻、第469-476ページ (1972年)] 及び分子量 100,000 のポリペプチドを主成分とし、65,000、36,000 及び 20,000 のもの [C.R. ハワード及び A.J. ツッカーマン

(C.R. Howard and A.J. Tuckerman) : ヘパティス メモランダ (Hepatitis Memoranda)、H-576、1973年10月、U.S.A.] のサブユニットから構成されることが報告されている。又 N. スケノ、S. アイカワ及び N. イシダ (N. Sueno, S. Aikawa and N. Ishida) : 同誌、H-292、1972年4月、U.S.A.] は、HBsAg を尿素の存在においてドデシル硫酸ナトリウムによつて切断するドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動簡易分子量分析法 [コロウィック-カプラン (Colowick-Kaplan) : メソッド イン エンチモロジイ (Method in Enzymology) 第26巻、第3ページ (1972年)] によつてそれが分子量 25,000、28,000 及び 33,000 のポリペプチドのサブユニットからなることを報告している。

このような HBsAg のサブユニットの探索は、そのサブユニットと抗原性の関係を明らかにし、より抗原性の特異部位を取り出すことを目的としており、ひいては効率的なワクチン、試薬の原料と

しての利用、HBsAgの抗原基の研究への利用を図ろうとするものである。

本発明の共同研究者等も先に、このHBsAgの抗原性をもつサブユニットの回収法として、HBsAgを脱リピド化(delipidation)することのできるある種の界面活性剤の存在下で加熱処理することによつて、HBsAgとしての抗原性を保持した分子量約55,000の単一のポリペプチドのみのサブユニットからなる大きさが約18-20nmの均一な球形粒子(HBsAg₅₅)に変換することができることを開示している(特開昭50-160420)。

本発明は、このような事実を背景としてなされたものであり、HBsAgの抗原性を持つ粒子の回収法として新たな方法を発明し、その方法によつて新規性状を有する、すなわち等電点pH5.5-6.5、分子量2-4百万、比重1.80-1.24、直径180-220Åの球形粒子の^{粒子}高い抗原性を保持した均一な変性HBsAgを提供することに成功したのである。

本発明はHBsAgをオキシエチレンを分子中に平

特開昭53-104724(3)
均7-10モル含有するポリオキシエチレンアルキルフェノール及びオキシエチレンを分子中に平均約20モル含むポリオキシエチレンモノアルキルエステルから選ばれた非イオン界面活性剤と尿素、グアニジンから選ばれたタンパク変性剤の存在において加熱処理し、均一な変性HBsAg粒子の抗原性画分を分取することを特徴とする等電点pH5.5-6.5、分子量2-4百万、比重1.80-1.24、直径180-220Åの球形粒子を有する高い抗原性を保持する均一な変性HBsAg粒子の製造方法である。

本発明において用いられるHBsAgは前述の公知の方法によつて血漿又は血清から比較的純粋に得られるが、α-及びβ-グロブリンを含む血漿画分、例えばコーンのアルコール分画法におけるN-1画分は原料として最も好ましい。かくして得られたHBsAgはそのまま、好ましくは更に精製して本発明に用いられる。

すなわち、前記の公知の方法で得られたHBsAgはセファデックスG-200(スウェーデン、ファ

ーマシア社製市販)のようなデキストランゲル、バイオゲルP-300(バイオーラッド社製市販品)のようなポリアクリルアミドゲル、又はセファロース6-Bのようなアガロースゲルである分子重量約3000ないし150,000の物質を対象として分子篩クロマトグラフィーに用いられる親水ゲルを通して、分子量の小さい夾雑物を除去することが推奨される。夾雑物の除去はHBsAgの塩化ナトリウム等張緩衝溶液(pH6-8)を同じ緩衝液で平衡化した上記のゲルカラムを通過させて行うことができる。

本発明に用いられる界面活性剤は、オキシエチレンを分子中に平均7-10モルを有するポリオキシエチレンアルキルフェノール型の界面活性剤、例えばポリオキシエチレン(9)、オクチルフェノール、及びオキシエチレンを分子中に平均20mol含むポリオキシエチレンソルビタンモノアルキルエステル型の界面活性剤、例えばポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレートなどから選ばれた非イオン界面活性剤である。

界面活性剤の添加量は0.1-2.0%W/V、好ましくは、0.25-1%W/Vである。

本発明で用いられるタンパク変性剤は尿素、グアニジン等である。その添加濃度は、尿素では2-8M、好ましくは4-6Mであり、グアニジンでは1-6M、好ましくは2-4Mである。

加熱は緩衝液でほぼ中性に保持された水溶液中で行われ、温度は30-50℃、好ましくは35-40℃で、反応時間は5-120分間、好ましくは20-50分間処理される。

この処理によつて生成する変性HBsAg粒子は等電点分画法[スベンスゾン、H:アクトケミカスキャンジナピカ(Svensson, H: Acta Chem. Scand.) 15, 325, (1961), 16, 456 (1962).]に従つて分画すると等電点3.0-4.0、5.0-5.5、5.5-6.5を示す3成分として確認され二次元拡散法[イムノケミストリー(Immunochemistry) 2, 235 (1965)], ラジオイムノアッセイ法[最新医学, 27, 1253 (1972)]によつてHBsAgの抗原性を分析す

るとpH 5.5 ~ 6.5の画分にその抗原性が集約されている故、この画分を分取する。

この処理に加えて、2-メルカプトエタノール、ジチオスレイトール等の還元剤を加温処理反応液に添加することは、別の興味ある結果を導いた。すなわち2-メルカプトエタノール等の還元剤を0.5 - 1.5 % W/V、好ましくは0.75 - 1.25 % W/Vの量でタンパク変性剤及び非イオン界面活性剤に加えて加温処理反応液に添加すると、HBsAgの変性化が促進されることを示唆する結果を得た。この処理によつた場合も等電点分画法による各成分の等電点はpH 3.0 - 4.0、5.0 - 5.5、5.5 - 6.5を示し、抗原性を保持するのは、pH 5.5 - 6.5の画分に存在する。

この場合、この等電点pH 5.5 - 6.5の変性HBsAgの抗原性は還元剤の存在下では非常に低下し、還元剤を除去することによつて回復する。

等電点pH 5.5 - 6.5の変性HBsAgの回収は等電点分画法によつてpH 5.5 - 6.5の画分を集め、公知の方法に従つて、例えば十分量のリン緩衝液

に対して透析し、遠心分画法等によつて濃縮し、更にゲル濾過を行うことによつて、タンパク変性剤、界面活性剤、還元剤を除去することによつて水溶液として得ることができる。

このようにして得られた均一な変性HBsAg粒子は高い抗原性を有し、等電点は、pH 5.5 - 6.5を有し、密度勾配超遠心分析法[ジャーナル オブ バイロロジイ、7, 569 (1971)]による比重は、1.80 - 1.24、電子顕微鏡所見による粒子直径[ネーチュア (Nature)、218, 1057 (1968)]は、直径180 - 220 Åの球形粒子で、これらからその分子量を推定すると[ヘパティティス メモランダ (Hepatitis Memoranda) H-17日、(1971)、USA] 20.0万 ~ 40.0万である。又その構成サブユニットは、アクリルアミドゲル電気泳動簡易分子量分析法[メソッド イン エンチモロジイ (Method in Enzymology)、26, 3 (1972)]によると、分子量55,000、32,000、27,000のものから成り立っていた。

本発明による均一な変性HBsAgは高度に精製され、抗原性の高い粒子であるので、感染性のない、副作用の少ない効率的なコンポーネントワクチンの材料として用いることができる。

又HBsAgの抗原基その他の性状を研究のために、このHBsAgを構成しているサブユニットから酵素処理などの方法によつて、切断してハプテンを得る[例えばステワード、J.M. ヤング J.D. 及びベンジャミン I.E. (Steward, J.M., Young, J.D. and Benjamin, I.E.) : バイオケミストリ (Biochemistry) 第5巻、第3396ページ、1966年] 目的の原料として好適である。

更に、その高度な純度と抗原性からHBVの抗原性の測定上標準抗原試薬として用いるのに適していることは言うまでもなく、又一定の抗体活性を有する抗体を得るための免疫材料として好適に用いられる。

本発明を更に具体的に説明するために以下実施例を掲げるが、実施例の記載は本発明を何ら限定するものではない。

実施例 1

HBsAg陽性と判定されたブール血漿1ℓを用い超遠心分離法によつて精製して得た精製HBsAgを原料として用いた。精製HBsAgの抗原価は逆受身赤血球凝集反応(RPHA)法[G.N. ビヤス(G.N. Vyas)ら、ザジャーナル オブ イムノロジイ 第100巻(2)、第294ページ(1968年)]によつて測定して1:320,000であつた。この精製HBsAgは、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動簡易分子量分析法(前出)によつて分子量が25,000、28,000及び33,000のポリペプチドのサブユニットからなることが認められた。このHBsAgの0.15 M濃度の塩化ナトリウムで等張としたpH 7.5、0.01 M トリス-塩酸緩衝溶液5 mlを同一緩衝溶液で平衡としたセファデックスG-200の2.5 cm × 45 cmのカラムを用いてゲル濾過して、最初に流出して来たHBsAg分画17 mlを集め、後で流出する夾雑物溶液と分離した。このHBsAg溶液を同一緩衝溶液に対して減圧透析して濃縮し、6 mlとし

た後、これに最終濃度 0.5 % となるようにポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノオレート (P E B) 及び 4 M 量の尿素を加え、37℃で30分間加熱処理を施した。処理を終った液は 0.15 M 塩化ナトリウムで等張化した 0.1 % の P E B を含む pH 8.0 の 0.01 M トリス塩酸緩衝液で平衡させたセファデックス G-200 の 2.5 × 45 cm のカラムを用いてゲル濾過した。分離されてきた変性 HBeAg 粒子から抗原性を有した画分を集め、塩化ナトリウムで等張とした pH 7.5 の 0.01 M トリス塩酸緩衝液で平衡としたセファデックス G-50 の 1.5 × 60 cm のカラムを用いてゲル濾過して尿素及び P E B を除去した。このようにして得られた均一な変性 HBeAg 粒子の水性懸濁液を減圧透析することによつて濃縮して 2 ml とし、HBeAg の抗原性を保持する変性 HBeAg の濃縮溶液を得た。

このものは、等電点 pH 5.5 - 6.5 であり、分子量 2 ~ 4 百万で、分子量 55,000、32,000、27,000 のサブユニットから構成されており、

熱処理を施した。

処理を終えた液は 1 % T W - 80 (ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノオレート)、6 M urea 中 37℃ 30 分処理後、アンホライン pH 2.5 - 8 範囲で 0.1 % T W - 80、6 M urea 中、常法に従つて 4℃ で、等電点分画を行い、pH 5.5 ~ 6.5 の等電点を有する画分を回収した。この画分を 0.15 M 塩化ナトリウム溶液に対して減圧透析してポリオキシエチレン (9) オクテルフエノール及び尿素を除去するとともに濃縮して 10 ml の変性 HBeAg 粒子を含む溶液を得た。このものは等電点 pH 5.5 - 6.5 (等電点ピーク 6.0) であり、分子量 2 - 4 百万で分子量 55,000、32,000、27,000 のサブユニットから構成されており、抗原価は 1 : 1,280,000 (R P H A 法) で、回収率は 70 % であつた。

実施例 3

実施例 1 を繰り返した。但し、ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノオレート (P E B) 0.5 % 濃度及び尿素 4 M 量に加えて、1 % 濃度に

抗原価は R P H A 法によつて 1 : 1,280,000

であつた。回収率は 65 % であつた。

実施例 2

HBeAg 陽性のプール血清 10 ml を用い、アフィニティークロマトグラフィー法で精製して得た抗原価 1 : 320,000 (R P H A 法) 精製 HBeAg を 1 字加入原料として用いた。この精製 HBeAg は S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動簡易分析法によつて、分子量が 17,000、25,000、28,000、33,000、40,000、52,000 および 60,000 の 7 種のポリペプチドのサブユニットが認められた。精製 HBeAg の 0.15 M 塩化ナトリウムで等張とした pH 7.2、0.05 M リン酸緩衝液 30 ml を、同一緩衝液で平衡としたバイオゲル P-300 の 5 × 90 cm のカラムを用いてゲル濾過し、最初に流出して来た HBeAg 画分 150 ml を分取した。この溶液を同一緩衝溶液に対し減圧透析して、濃縮し、16 ml とした後、1 % となるようにポリオキシエチレン (9) オクテルフエノール及び 4 M 量の尿素を加え、45℃で20分間加

2 - メルカプトエタノールを添加して 40℃、30 分の加温処理を用いた。

このものは、等電点 pH 5.5 - 6.5 であり、分子量 2 ~ 4 百万で、分子量 55,000、32,000、27,000 のサブユニットから構成されており、回収率は 1 ~ 5 % であつた。

未処理の HBeAg 並びに実施例 2 及び 3 の場合の等電点分画像をそれぞれ第 1 ないし第 3 図に示す。

4. 図面の簡単な説明

第 1 ~ 3 図は未処理 HBeAg 並びに実施例 2 及び 3 において処理した場合の等電点分画面である。

第 1 図は未処理の場合、
第 2 図は実施例 2 の処理の場合、
第 3 図は実施例 3 の処理の場合、
をそれぞれ示す。

なお図中の斜線面積は抗原性活性画分を示す。

代理人 浅 村 皓

外 3 名

図 1

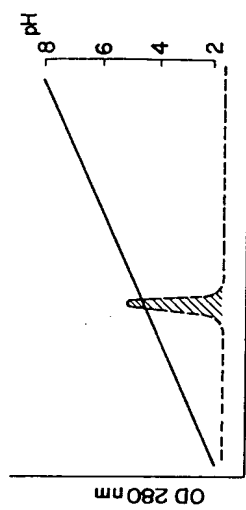


図 2

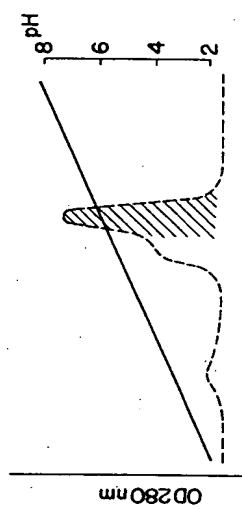


図 3

